

방사모드에 따른 레이저 치료 효과

최덕수¹ · 임현수¹ · 이병구¹ · 네클라 커나르^{1,2}

¹충남대학교 의과대학 의공학교실, ²터키 코카엘리 대학교 물리학교실

A Effect of Photo Dynamic Therapy for LAZER Wave Mode

Deog Su Choi¹, Hyun Soo Lim¹, Byung Koo Lee¹ and Necla Kenar^{1,2}

¹Department of Biomedical Engineering, College of Medicine, Chungnam National University

²Department of Physics, Kocaeli University, Izmit-Kocaeli, Turkey

(Manuscript received 18 July 2016; revised 22 August 2016; accepted 23 August 2016)

Abstract: US Food and Drug Administration (FDA) approved as a innovative cure for cancer, 1996. The effect is death of cancer cells through necrosis, apoptosis. Mainly the Continuous Wave mode (CW) use for PDT Laser. It sting, the question including itch, and etc. Reportedly, the increase of temperature with the perforated edema, ulcer, necrosis. The Thermal relaxation time and Oxygen recovery time is necessary. To give a normal oxygen recovery time of the cell, used Pulse mode. Progress, it was Burst Pulse mode when easing the thermal wake, the simplicity was secured, the PDT effect is good. Excepted in control group CW, Pulse, Burst pulse mode were incubated with various concentrations of 5-aminolevulinic acid hydrochloride (ALA-5). The tumor size reduction CW mode (44%), Pulse mode (48%), Burst pulse mode (53%) at 4 week after PDT with 0.3, 0.3, 0.3 mg/ml of ALA-5. After 4 hours, investigation of 100, 100, 100 J/cm² laser irradiation. The pulse mode was superior in experimental data analysis. And it was the Burst pulse mode edge head of a family effect.

Key words: Photo Dynamic Therapy (PDT), Continuous Wave mode (CW), Pulse mode, Burst pulse mode, 5-aminolevulinic acid hydrochloride (ALA-5)

1. 서 론

광역학치료(Photodynamic Therapy, PDT)는 1996년 미국식약청(Food and Drug Administration, FDA)에서 공인된 후, 암 치료의 획기적 치료법으로 인식되어 피부, 폐, 위, 생식기, 방광, 전립선 등의 악성종양에 새로운 형태의 치료법으로 각광받고 있으며, 국제광역학회(International Photodynamic Association, IPA)와 2002년 설립된 대한광역학회(Korean Photodynamic Association, KPA)는 많은 연구 논문발표와 치료증진, 정보교환으로 PDT를 널리 알리고 있다[1-4].

PDT는 체내분포산소와 빛에 예민한 광감작제(Photo-sensitizer, PS)가 적절한 파장의 레이저 빛에 화학적 반응을 일으켜 높은 에너지를 갖고 있는 일항산소(singlet oxygen)와 쌍을 이루지 않아 활발히 반응하는 자유라디칼(Free radical)을 생성해 암세포를 선택적으로 파괴하는 치료방법이다[5,6].

PDT를 이용한 암 치료는 방사선 치료나 항암화학요법에 비해 치료 후의 부작용과 잔여독성을 최소로 줄일 수 있고, 기능 보존이 필요하거나 수술이 어려운 종양의 경우, 종선량의 크기와 관계없이 동일부위를 반복 치료할 수 있다[7,8].

그러나, PDT에 사용하는 레이저가 대부분 연속방사방식(Continuous Wave mode, CW mode)이며, 그로인해 조직의 열 변성과 비가역적 세포 파괴 등으로 혈관손상, 세포 내부기관 파괴 등이 발생 할 수 있다. 빛의 흡수로 조직의 온도를 증가시키는 광열역학적효과(Photo-Thermal effect)는 레이저 빔의 강도가 높을 때 생체조직에 흡수된 에너지

Corresponding Author : Hyun Soo Lim
Department of Biomedical Engineering, College of Medicine,
Chungnam National University
TEL: +10-9413-7829
E-mail: hslim@cnu.ac.kr

의 대부분이 열로 변하기 때문이다. 이때, 레이저 빔이 도달하는 부위에서부터 지수함수로 온도감소가 이루어진다[9].

조사된 레이저의 에너지가 생체조직에서 열에너지로 변하여 온도가 일어난다. 이때, 40°C 이하에서는 가역적인 열 손상으로 약간의 조직 수축이 발생한다. 빛의 흡수는 레이저의 파장, 발색단(Chromophore)의 함량에 따른 산란과 흡수, 생체조직에 함유하고 있는 물의 양 등에 의하여 영향을 받는다[10]. 발색단(Chromophore)은 특정 파장을 흡수하는 물질들로, 인체에서는 단백질, 물, 헤모글로빈, DNA, 콜라겐, 멜라닌 등이 있다. Lambert-beer의 법칙에 의하면 물질에 의하여 흡수되는 빛의 양은 농도와 통과하는 길이에 비례하는 발색단의 함량이 증가할수록 빛의 흡수율(absorption)이 증가하게 된다[11]. 발색단이 흡수하는 특정파장은 조성에 따라 다르며, 흡수율은 함량에 따라 다르다. 자외선 영역의 단파장인 200~400 nm은 대부분 산란되어 0.1 mm 이하로 얇게 침투하며, 적외선 영역인 1300 nm 이상의 경우, 물에 대한 흡수계수가 매우 높아서 0.1 mm이내의 피부 표피층에서 대부분 흡수된다. 가시광선과 근적외선 대역의 500~1300 nm의 경우, 발색단에 의한 산란과 흡수가 가장 적게 일어나며, 최대 4 mm까지 침투한다[12,13]. 또한, 면역계의 부조화로 암 치료 후 가렵고, 정상 조직 괴사, 화끈거림, 물집이나 부종, 세포조직괴사 등의 부작용이 보고되었다[14]. 그동안 보다 안정적이며 치료효과가 높은 치료법이 절실히 요구되어 왔다. 본 연구는 유방암 세포를 이식한 쥐 모델에, 연속방사모드(CW mode)와 펄스 모드(Pulse mode), 버스트 펄스 모드 (Burst Pulse mode)를 사용하여 열적 완화(Thermal Relaxation), 체내 산소 회복 시간(Oxygen Recovery Time)등이 적용 되도록 하여 종양성장 억제 효과 및 치료효과를 측정 하고자 한다.

II. 대상 및 방법

배양한 유방암 세포를 누드마우스에 이식 후, 선택적 3 가지 방사 모드(CW, Pulse, Burst Pulse mode)와 635 nm의 파장을 발생하는 PDT Laser 장치(Laxcell T3000 Bio-Optics Co., Korea) 그리고 ALA-5 광감작제(Sigma, St. Louis, MO, USA)를 사용하여 생체조직의 열적특성과 열적완화를 측정하였다.

1. 생체조직에서의 열적 특성

CW mode는 레이저 방사초기에 급격한 온도 상승으로, 43.7°C까지 기록되어 생체조직에 비가역적인 열적 파괴현상이 있다. Pulse mode는 펄스 반복율 50% 일 때 33.5°C에서 고정되고, 비가역적 조직 손상은 없다. Burst Pulse mode는 온도상승이 완만하며, 33.4~33.5°C에서 고정되고,

표 1. 세 가지 방사모드에 대한 온도보상.

Table 1. Thermal compensation of CW, Pulse, Burst pulse mode.

레이저방사모드	10 J/cm ² (°C)	평균온도 (°C)
C.W mode	0.27	39.4
Pulse mode	0.09	31.7
Burst pulse mode	0.08	30.7

비가역적인 조직손상이 없다[15].

C.W mode는 PDT 레이저 치료에 따른 열적 영향으로 천공, 협착 등을 유발할 가능성이 크고, 펄스모드나 버스트 펄스모드는 생체의 조직에 안정적 동작 특성을 가진다.

온도 변화가 C.W mode, Pulse mode, Bust pulse mode에서 10 J/cm²당 온도 상승폭이 지속적 열에너지 축적 특성을 가진 연속 방사 모드가 가장 높다. 펄스모드 중 듀레이션 오프 타임을 가진 Burst pulse mode가 0.08°C로 가장 안정성이 높은 열적 특성을 가진다(표 1), 버스트 펄스 중에서도 약 30 msec의 짧은 펄스로 조사할 때 열적효과가 우수함이 알려져 있다[16].

적절한 광량이 조사 되었는지 식(1)로 에너지 밀도를 확인할 수 있다.

$$\begin{aligned} \text{Fluence} &= \text{intensity} \times \text{time/area} \\ &= \text{watts} \times \text{seconds/cm}^2 \end{aligned} \quad (1)$$

열에 약하거나, 정상 조직이 손상되는 열적 현상(Thermal effects)으로 부터 보호 하고자 할 경우, 짧은 펄스폭을 가진 Burst pulse mode를 이용하여 비가역적 열적 손상을 예방할 수 있다.

광학적 응답과 열적 응답은 광과 생체 조직 사이의 상호작용으로 나타난다. 입사광이 조직에서 반사, 산란, 투과, 흡수의 과정을 거친다. 이때, 흡수된 빛이 열로 변환된다. 형광물질, PS등에 의하여 흡수된 빛은 발광 현상, 광화학적 반응이 발생 할 수 있다.

2. 열적 완화시간

조직에서의 반응은 광 공급시간, 에너지밀도(laser energy density), 파장(wave length), 방사된 영역의 크기 등 여러 요소의 변화로 다양한 결과를 얻을 수 있다. 열 발생률은 국소적인 빛 흡수와 국소적인 영향의 곱에 비례 한다. 빛의 흡수에 의해 조직의 광 응고 및 절제가 발생됨을 알 수 있다(표 2).

빛과 생체조직의 상호작용 관계는 임상의학 에서 유용하며, 생체조직에 대한 빛의 흡수,반사, 회절, 투과 및 형광분광법을 이용한 진단과 빛의 에너지를 응용한 물리적, 화학적

표 2. 열적완화시간.

Table 2. Thermal relaxation times of important laser targets.

Subject	Size (μm)	Thermal relaxation times
Tattoo ink particle	0.5-4	10 ns
Melanosome	0.5-1	1 μs
Erythrocyte	7	2 μs
Blood vessel	100	5 ms
Blood vessel	200	20 ms
Hair follicle	200	10-100 ms

치료를 하게 된다[17].

3. 실험동물의 사육

6주령의 누드마우스(BALB/c nude mice), 학명은 CAnN.Cg-Foxn1 nu/CrIjOri이다.

12마리를 온도 23 ± 2°C, 습도 60 ± 10%, 16~18시간 간격 명암교대 환경(light-dark cycle)에서 적응시간을 2주 동안 가진 후, 실험을 실시하였다.

4. 세포 주 배양

유방암(breast cancer)세포 주 배양은 MB231 Cell Line 을 5% CO₂, 37°C 조건하에서 1%v 페니실린, 2 mM L-글루타민과 10% FBS이 첨가된 동물세포배양배지(Dulbeco's Modified Eagle's Medium: DMEM) incubator에서 배양하였다.

5. 유방암 조직의 생성

BALB/c 누드마우스 오른쪽 옆구리에 배양된 유방암



그림 1. 암 세포 주입 6주 후의 누드마우스.

Fig. 1. Ca. cell injection after 6 weeks image.

MB231 세포를 5 × 10⁶ cell /0.1 ml 피하주사 하고, 무특이 병원체(Specific Pathogen Free, SPF) 상태의 사육실에서 명암교대 환경을 유지하며 16~18시간 동안 관찰 하였다.

6. 광감작제(Photosensitizer: PS) 투여

대조군을 제외한 CW, Pulse, Burst pulse mode군에 PS 를 주입하여 실험을 진행하였다.

PS는 Sigma의 5-aminolevulinic acid hydrochloride (ALA-5)를 사용 하였다. ALA-5의 농도는 20 mg/kg로 하였다. 암 세포 주입 6주 후 누드마우스의 오른쪽 옆구리에 0.3 cc씩 투입하고, 4시간 경과 후 각 그룹에 알맞은 레이저를 조사 하였다. 실험 처치 후에는 SPF를 유지하면서 일정기간 빛을 최대한 차단하여, 체내에 남아있는 PS에 의한 계획에 없는 광역학적 반응의 발생을 최소화 하였다(그림 1).

136

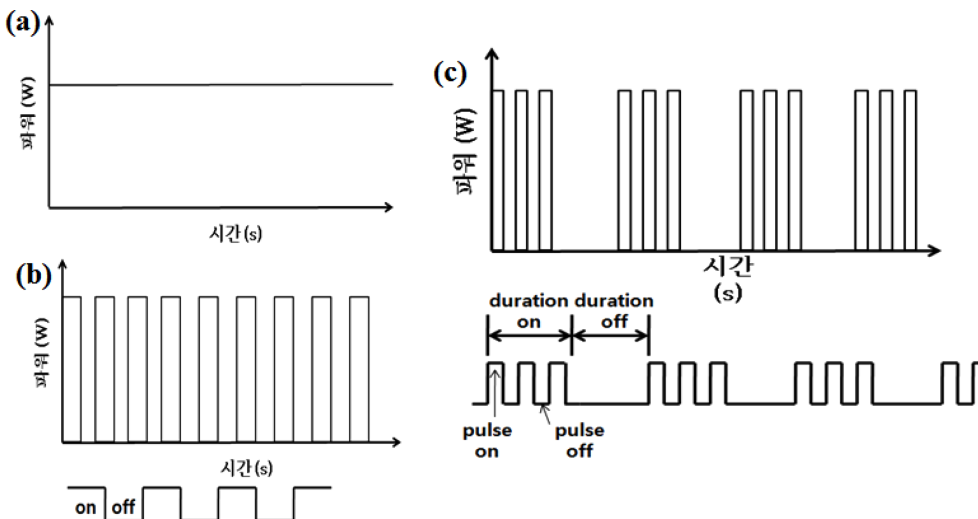


그림 2. (a) 연속모드, (b) 펄스 모드, (c) 버스트 펄스 모드.

Fig. 2. (a) Continuous Wave mode, (b) Pulse mode, (c) Burst Pulse mode.

표 3. 종양의 크기 변화.

Table 3. Tumor size (mm³) at each time of assessment.

Time	Control	Continuous wave mode	Pulse mode	Burst pulse mode
Baseline	406/410/413 평균 :410	466/470/472 평균 :469	306/308/325 평균 :313	446/452/454 평균 :451
Week 1	435/439/440 평균 :438	475/477/482 평균 :478	314/316/327 평균 :319	442/448/454 평균 :448
Week 2	553/555/558 평균 :555	433/434/440 평균 :436	280/286/288 평균 :285	439/443/409 평균 :430
Week 3	620/622/626 평균 :623	362/369/373 평균 :368	224/226/229 평균 :226	311/312/315 평균 :313
Week 4	705/711/712 평균 :709	261/265/266 평균 :264	157/161/166 평균 :161	210/211/214 평균 :212

7. 실험장치

PDT 레이저는 그림 2에서 보듯이, 입력된 시간동안 일정한 출력의 광을 연속하여 발생시키는 CW mode와 일정한 주파수를 갖고, 입력된 시간 동안 지정된 펄스 형태의 광을 발생시키는 Pulse mode 그리고 설정된 ON OFF time을 반복하여 ON duty period, OFF duty period의 출력이 유지되고 반복되는 펄스 형태의 Burst pulse mode를 선택할 수 있다[18].

PDT 레이저 조사 없이 대조군을 지속적으로 관찰하였으며, 설정된 PDT 레이저 방사모드로 CW군, Pulse군, Burst Pulse군에 CW mode, Pulse mode, Burst Pulse mode로 조사하여 치료 하였다.

III. 결 과

3 가지 방사모드에 대한 치료 효과

초기 누드마우스의 평균 몸무게는 대조군 29.61 g, CW mode군 25.93 g, Pulse mode군 29.37 g, Burst pulse mode군 27.45 g 이었다.

종양의 크기는 각 군별로 3마리 누드마우스의 평균값을 얻어 Tomayko & Reynolds[19]의 공식(식 2)을 이용해 측정하였다. 이때 C는 경험적 보정계수 0.873 이다. 측정 된 각 군별 종양의 크기는 대조군 410 mm³, 연속 방사군 469 mm³, 펄스 모드군 313 mm³, 버스트 펄스 모드군은 451 mm³이다.

$$V = Clwh \quad (2)$$

V: 종양크기(Tumor size), C: 보정계수, l: 장축, w: 단축, h: 높이

누드마우스에 PS를 CW mode군 0.3 mg, Pulse mode군 0.3 mg, Burst pulse mode군 0.3 mg을 주사 후 암실 계류시간은 4~6시간 실시하였다. CW mode 군은 100 mW/

cm², 100 J/cm²를 연속조사 하였고, Pulse mode 군은 100 mW/cm², 50 msec로 분할조사 하여, 총 100 J/cm²를 조사 하였으며, Burst pulse mode 군은 100 mW/cm², 50 msec로 분할조사 하여, 20 J/cm²을 조사하고, 15분 휴지 하여 냉각시간을 갖고, 100 mW/cm², 50 msec로 분할조사 하여, 80 J/cm²를 조사하여 총 100 J/cm²를 조사하였다. 12마리 모두 치료 후 종양부위 피부가 선홍색으로 변하였으며, 그중 CW mode 군은 좀 더 진하여 진홍색으로 보였고, 그중 한 마리는 약간의 물집이 보였으며, 1주일 후부터 차차 회복 되었으며 2주일 후에는 거의 보이지 않고, 3주일 후에는, 약간의 흔적만 보였다. 그룹별 치료 후의 경과를 1주일 단위로 4주간 종양의 크기를 측정하고 비교 수치들을 정리하였다(표 3).

치료 1주일 후, 대조군은 410 mm³에서 438 mm³로 6.8%, CW mode군은 469 mm³에서 478 mm³로 1.9%, Pulse mode군은 313 mm³에서 319 mm³로 1.9%로 증가한 반면 Burst pulse mode군은 451 mm³에서 448 mm³로 0.7% 감소의 양상을 보였다.

치료 4주 후, CW mode군은 43.7%, Pulse mode군은 48.6%의 종양 크기 감소가 있으며, Burst pulse mode군은 53.0% 감소의 결과를 나타냈다. 대조군은 지속적인 종양의 성장을 보여 주고 있다.

IV. 고찰 및 결론

광역학치료는 주어진 체적 내의 산소를 이용하는 것으로 장시간의 계속된 치료는 산소 분포의 저하를 초래하는 단점이 있다. 이를 개선하기 위한 방법으로 전리 방사선을 이용한 치료에서 사용하는 분할 조사 방법이 연구 되었다. 여기서 분할이라는 단어는 Split와 Fractionation 이라는 두 가지로 표현 되었다. 일반적으로 분할은 Fractionation으로 표현되며 이는 총 선량을 나누어 조사한다는 의미이다. 반면에 Split는 intra-fractionation의 개념으로 1회 조사되는

선량을 쪼개어 조사 하는 것이다. P Babilas[20] 등의 연구에서는 High Dose와 Low Dose 일 때 분할 조사를 실시하여 그 결과를 비교하였다. high dose는 100 mW/cm², 100 J/cm², low dose는 25 mW/cm², 100 J/cm²로 설정하고 각각을 연속(continuous) 조사와 분할 조사를 하여 비교해 보았다. 즉, 동일한 선량 일 때의 연속 조사와 분할 조사 그리고 고 선량과 저 선량 일 때의 연속 조사와 분할 조사를 비교한 것이다. 분할 조사는 먼저 20 J/cm²을 조사하고 15분 간 휴지기를 갖은 후 나머지 80 J/cm²를 조사하는 것이다. 결과는 연속, 분할 조사에 관계없이 고 선량 일 때만 치료 효과가 있었다. Simone Muller[21] 등의 논문은 분할 조사 방법을 intra-fractionation의 개념으로 분할 시간을 0.05초와 30초 그리고 연속 조사로 하였다. 0.05초의 분할 조사는 광역학치료 기기가 발전한 현재의 Pulse mode와 동일한 개념이다. 결과는 0.05초의 분할 조사에서 가장 좋은 효과를 얻었다.

기기의 발달로 인해, Pulse mode를 split한 Burst Pulse mode의 등장은 치료 mode 선택에 다양화를 만들었으며, 증상에 따른 치료의 다변화를 만들었다고 할 수 있다. 나아가 광역학치료를 발생하는 체내 산소 재분포의 문제를 해결하는 방법이 될 수 있을 것이다.

본 논문에서는 CW mode, Pulse mode, Burst Pulse mode 조사 방식을 달리할 때, 종양성장 억제효과의 차이가 얼마나 있는지 확인하기 위하여 누드마우스 BALB/C를 선택하고, 유방암 세포인 MB231 Cell line 세포 주를 이식하여, 유방암 쥐 모델을 제작하여 군별 설정된 계획에 따라 치료를 시행하여 종양의 부피 변화를 비교하여, 종양성장 억제효과를 다음과 같이 확인 하였다.

1. 종양 부피의 변화를 볼 때, 대조군에 비해 연속 방사 모드군(43.7%), 펄스 모드군(48.6%), 버스트 펄스 모드군(53.0%), 모두에서 종양성장 억제 및 치료 효과가 확인 되었다.

2. CW군(43.7%)보다 Pulse mode군(48.6%), Burst pulse mode군(53.0%)에서 더 큰 종양 성장 억제 효과가 확인되고, Pulse mode군(48.6%)에 비해서는 Burst pulse mode군(53.0%)에서 종양 성장 억제 작용 및 치료 효과가 더 크게 나타났다.

본 실험의 결과를 종합하면, 현재의 광역학치료 효과에 의문을 제시하는 것은 의미 없는 사항이며 투여하는 선량의 크기(출력밀도: power density, 에너지 밀도: energy density)와 별개로 mode 선택으로 치료 결과가 확연히 달라질 수 있음이 확인 되었다. 이는 광역학치료를 있어 매우 중요한 매개 변수가 될 수 있으며, 동일한 선량이라도 mode의 선택에 따라 치료 예후가 변화 될 수 있음을 나타낸다. 본 실험에서는 Burst Pulse mode에서 53.0%의 종양성장 억제

및 종양감소 효과를 보여, 치료 mode의 선택에 따라 치료 효과의 차이가 나타나는 것을 보여주었다.

References

- [1] Edell ES, Cortese DA, "Photodynamic Therapy in the Management of Early Superficial Squamous Cell Carcinoma as an Alternative to Surgical Resection." *Chest* 102: pp. 1319-22, 1992.
- [2] Moan J, Berg K, "Photochemotherapy of Cancer: *Experimental Research*", vol. 55, pp. 931-48, 1992.
- [3] S.G. Rockson, D.P. Lorenz, W.F. Cheong and K.W. Woodburn, Photoangioplasty, "An Emerging Clinical Cardiovascular role for Photodynamic Therapy," *Circulation*, vol. 102, pp. 591-596. 2000.
- [4] S.H. Yoon, K.T. Han, G.N. Kim, S.L. Lee, "Effect of Photodynamic Therapy in Lung Cancer." *Tuberc Respir Dis*, vol. 57, pp. 358-63, 2004.
- [5] Hampton JA, Selman SH, "Mechanism of Cell Killing in Photodynamic Therapy using a Novel in vivo/in vitro Light Culture System", *Photochem Photobiol*, vol. 56, pp. 235-43, 1992.
- [6] S. Hatz, j.d. Lambert, P.R. Ogilby, "Measuring the Lifetime of Singlet Oxygen in a Single Cell, Addressing the Issue of Cell Viability", *Photochem Photobiol Sci*. vol. 6, 2007.
- [7] Morgan, J, Gray, A.G and Huehns, E.R, "Specific Targeting and Toxicity of Sulphonated Aluminium Phthalocyanine Photosensitised Liposomes Directed to Cells by Monoclonal Antibody in vitro", *Br. J Cancer*, vol. 59, no. 3 pp. 66-70, 1983.
- [8] B.K. Lee, H.S. Lim, Necla Kenar, "GafChromic RTQA Film Dosimetry for Laser Beam with Photodynamic Therapy" *Journal of Biomedical Engineering Research*, vol. 34, pp. 73-79, 2013.
- [9] Jacques, S.L. "Laser-Tissue Interactions, Photochemical, Photothermal, and Photomechanical", *The Surgical clinics of North America*. vol. 72, no. 3, pp. 531-558, 1992.
- [10] Kocsis, L., Herman, P., & Eke, A. "The Modified Beer-Lambert law Revisited", *Phys. Med. Biol.* vol. 51, no. 5, pp. 91-98, 2006.
- [11] Wobst, P., Wenzel, R., Kohl, M., Obrig, H., & Villringer, A. "Linear Aspects of Changes in Deoxygenated Hemoglobin Concentration and Cytochrome Oxidase Oxidation During Brain Activation", *Nerolmage*. vol. 13, no. 3, pp. 520-530. 2001.
- [12] Meinhardt, M., Krebs, R., & Anders, A. "Wavelength-Dependent Penetration Depths of Ultraviolet Radiation in Human Skin", *Journal of Biomedical Optics*. vol. 13, no. 4, 044030, 2008
- [13] Venugopalam, V., Nishioka, N.S., & Mikic, B.B. "The Effect of Laser Parameters on the Zone of Thermal Injury Produced by Laser Ablation of Biological Tissue". *Am. J. Ophthalmol.* vol. 116, no. 1, pp. 62-70. 1994.
- [14] Dougherty TJ, Gomer CJ, Henderson BW, Jori G, Kessel D, Korbek M, Moan J, Peng Q, Review, "Photodynamic Therapy", *J Natl Cancer inc*, vol. 90, no. 12, pp. 889-905, 1998.
- [15] H.S. Lim, "Photo Dynamic Cancer Therapy and Application of Laser" Gung media (Chung nam National University

- Press), 2010.
- [16] Bogdan Allemann I, Goldberg DJ (eds), "Basics in Dermatological Laser Applications" *Curr OProbl Dermatol. Basel Karger*, vol. 42, pp. 7-23.
- [17] Goldberg DJ: "Laser Dermatology", Berlin, Springer, 2005.
- [18] H.S. Lim, *et al*, "Biomedical Optics and Laser Treatment", *Optical Science and Technology*, vol. 7, 6-13, 2003.
- [19] Tomayko MM, Reynolds CP "Determination of Subcutaneous Tumor Size in Athymic (nude) Mice" *Cancer Chemother Pharmacol*, vol. 24, pp. 148-154, 1989.
- [20] P Babilas, V Schacht *et al*, "Effect of Light Fractionation and Different Fluence rates on Photodynamic Therapy with 5-aminolaevulinic acid in vivo", *Br: J of cancer*, vol. 88, pp. 1462-1469, 2003.
- [21] Simone Muller, Heinrich *et al*, "Enhanced Photodynamic Effects using Fractionated Laser Light", *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, vol. 42, pp. 67-70, 1998.